

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-146556  
(43)Date of publication of application : 29.05.2001

---

(51)Int.CI. C08L101/16  
A61K 47/48  
C08G 65/321

---

(21)Application number : 11-330065 (71)Applicant : NANO CAREER KK  
(22)Date of filing : 19.11.1999 (72)Inventor : KATAOKA KAZUNORI  
KAKIZAWA SUKEKUNI  
HARADA ATSUSHI

---

**(54) POLYION COMPLEX MICELL HAVING CORE-SHELL STRUCTURE**

**(57)Abstract:**

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide a method for stabilizing polyion complex micelles which can be utilized as a carrier of a polymeric electrolyte.

**SOLUTION:** The method for stabilizing polyion complex micelles having a core-shell structure to be formed of a block copolymer containing a hydrophilic segment and a chargeable segment and a polymeric electrolyte comprises allowing the chargeable segment which forms the core portion to carry at least one thiol residue and forming a disulfide bond of crosslinked stability between the chargeable segments via the thiol residues carried thereby.

---

**LEGAL STATUS**

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

117-157  
平成11年11月23日

(18)日本国特許庁 (JP)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2001-146556

(P2001-146556A)

(43)公開日 平成13年5月29日 (2001.5.29)

(51)Int.Cl.  
C 08 L 101/16  
A 61 K 47/48  
C 08 G 65/321

識別記号

P I  
A 61 K 47/48  
C 08 L 101/00  
C 08 G 65/32

コード(参考)  
4 C 076  
4 J 002  
4 J 005

審査請求 未請求 請求項の数? 0L (全 8 頁)

(21)出願番号 特願平11-330085

(71)出願人 597144879

(22)出願日 平成11年11月19日 (1999.11.19)

ナノキャリア株式会社

特許法第30条第1項適用申請有り 平成11年9月20日  
社団法人高分子学会実行の「高分子学会予稿集48巻12  
号」に掲載

千葉県柏市柏の道5丁目4番地6

(72)発明者 片岡 一則

千葉県柏市大庭1083-4

(72)発明者 稲澤 賢司

東京都足立区新田3-32-10複数ハイツ  
400号室

(72)発明者 原田 輝史

東京都文京区根岸2-14-21福島マンシ  
ン202

(74)代理人 100060782

弁理士 小田島 平吉 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 コアーケル構造のポリイオンコンプレックスミセル

(57)【要約】

【課題】 高分子電解質の還暉体として利用できるポリ  
イオンコンプレックスミセルの安定化法の提供に関する  
事。

【解決手段】 水性セグメントおよび荷電性セグメン  
トを含むブロック共重合体と高分子電解質とから形成  
されるコアーケル構造のポリイオンコンプレックスミ  
セルの安定化方法であって、コア部を形成する荷電性セ  
グメントに少なくとも1個のチオール残基を担持させ、  
該荷電性セグメント間でそれらに担持させたチオール残  
基を介するジスルフィド結合の架橋安定を形成させること  
による前記ミセルの安定化方法。

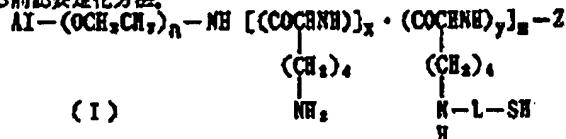
(2)

特許 2001-146556

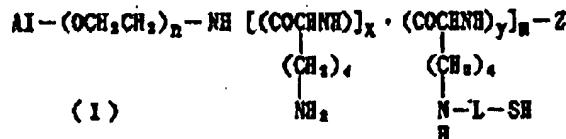
2

## 【特許請求の範囲】

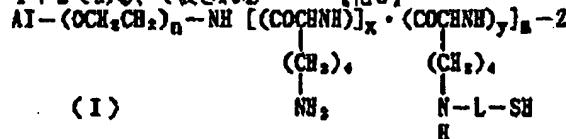
【請求項1】 水性セグメントおよび荷電性セグメントを含むブロック共重合体と高分子電解質とから形成されるコアーシェル構造のポリイオンコンプレックスミセルの安定化方法であって、コア部を形成するブロック共重合体荷電性セグメントに少なくとも1個のチオール残基を担持させ、該荷電性セグメント間で、それらに担持させたチオール残基を介するジスルフィド結合の網構を形成させることを特徴とする前記安定化方法。



式中、AIは水素原子またはアニオン重合開始剤の有機残基を示し、  
Zは水素原子または式-L-SHの残基を示し、  
LはC<sub>1-20</sub>アルキレン、C<sub>1-4</sub>アルキルフェニル、C<sub>1-4</sub>アルキルフェニレン-C<sub>1-4</sub>アルキル、フェニレンおよびカルボニル-C<sub>1-20</sub>アルキルからなる群より選ばれる連結基を示し。



式中、AIは水素原子またはアニオン重合開始剤の有機残基を示し、  
Zは水素原子または式-L-SHの残基を示し、  
LはC<sub>1-20</sub>アルキレン、C<sub>1-4</sub>アルキルフェニル、C<sub>1-4</sub>アルキルフェニレン-C<sub>1-4</sub>アルキル、フェニレンおよびカルボニル-C<sub>1-20</sub>アルキルからなる群より選ばれる連結基を示し、  
nは5~20,000の整数であり、  
mは5~10,000の整数であり、そしてxの単位とyの単位の割合は20:1~1:2である、で表される請求項1または2記載の安定化方法。



式中、AIは水素原子またはアニオン重合開始剤の有機残基を示し、  
Zは水素原子または式-L-SHの残基を示し、  
LはC<sub>1-20</sub>アルキレン、C<sub>1-4</sub>アルキルフェニル、C<sub>1-4</sub>アルキルフェニレン-C<sub>1-4</sub>アルキル、フェニレンおよびカルボニル-C<sub>1-20</sub>アルキルからなる群より選ば

れる連結基を示し、  
nは5~20,000の整数であり、そして荷電性セグメントがポリアミンまたはポリカルボン酸を含んでなり、かつ高分子電解質がポリペプチド、ポリブソイドペプチドおよびポリスクレオチドからなる群より選ばれる請求項1記載の安定化方法。

【請求項3】 ブロック共重合体が一般式(1)

【化1】

nは5~20,000の整数であり、  
mは5~10,000の整数であり、そしてxの単位とyの単位の割合は20:1~1:2である、で表される請求項1または2記載の安定化方法。

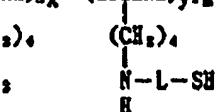
【請求項4】 一般式(1)

【化2】

ブロック共重合体と高分子電解質とから形成されたコアーシェル構造のポリイオンコンプレックスミセルであつて、水性媒質でコア部を形成する該ブロック共重合体のポリアミンセグメント(式(1)でmの繰り返し単位を持つセグメント)と高分子電解質とがイオン対を形成しており、そして該セグメント内の少なくとも1個のチオール残基を介して該共重合体が架橋していることを特徴とするポリイオンコンプレックスミセル組成物。

【請求項5】 一般式(1)

【化3】

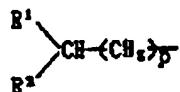


れる連結基を示し、  
nは5~20,000の整数であり、  
mは5~10,000の整数であり、そしてxの単位とyの単位の割合は20:1~1:2である、で表されるブロック共重合体。

【請求項6】 一般式(1)におけるAIが水素原子あ

(3)

特開2001-146556

るいは式  
【化4】

(上記式中、

(1) pは0～10の整数であって、かつR'およびR<sup>2</sup>は、独立して、水素原子、C<sub>1-10</sub>アルコキシ、アリールオキシもしくはアリール-C<sub>1-10</sub>アルキルオキシ基を示すか、または、R'およびR<sup>2</sup>は、一緒にになって、C<sub>1-10</sub>アルキルで置換されていてもよいエチレンジオキシ(-O-CH(R')-CH-O-)：ここでR'は水素原子またはC<sub>1-10</sub>アルキルである)もしくはオキシ(-O)基を示すか、または(1) pは0または1であって、かつR'およびR<sup>2</sup>は、一緒にになって单糖もしくはその誘導体の残基を構成する原子団を示す。の基である請求項5記載の共重合体。

【請求項7】一般式(1)におけるしがカルボニル-C<sub>2-4</sub>アルキルである請求項5または6記載の共重合体。

【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、コアーシェル構造を持つポリイオンコンプレックスミセルの安定化方法および安定化されたミセル、ならびに該ミセルの調製に使用できる特定のブロック共重合体に関する。該コアーシェル構造は、そのコア部がブロック共重合体の荷電性セグメントと高分子電解質のポリイオンコンプレックスからなり、そしてシェル部がブロック共重合体の親水性セグメントからなる。

## 【0002】

【従来の技術】カチオン性のブロック共重合体であるポリ(エチレンリコール)ーブロッキーーポリ(L-リシン)【以下、PEG-P(Lys)という場合あり】と、天然もしくは合成アニオン性单独重合体は、両者の間に働く静電的相互作用によって水中で自律的に会合し、球形のミセルを形成する。このミセルは粒径が数十ナノメートルで、内核のポリイオンコンプレックスをPEG外殻が覆ったコアーシェル構造を持っており、ポリイオンコンプレックスミセル(PICM)と呼ばれている(Harada and Kataoka, *Macromolecules*, 1995, 28, 5294-5299; Kataoka et al., *Macromolecules*, 1996, 29, 8556-8557; Harada et al., *Macromolecules*, 1998, 31, 283-294; Kabanov et al., *Macromolecules*, 1996, 29, 6797-6802)。

【0003】これらのPICMは、内核に種々のアニオン性高分子を保持することができる上、数十ナノメートルという粒径とコアーシェル構造により生体の異物

認識機構を回避することができるため、アンチセンスDNAや遺伝子治療のためのプラスミドDNAの運载体として利用することが考えられている。一般的にこれらのPICMは、生理的条件下で相当安定であるが、実際の使用に際しては、静脈注射による投与後の体内によってPICMが解離してしまうことや、血清タンパク質との相互作用すること、生理条件下での安定性が十分でない場合も存在する。このため、確実に目的部位へ到達するまで解離せずに存在するように、PICMの性質を改変する必要がある。PICMを安定化する目的で、共有結合による内核(コア)や外殻(シェル)を架橋することが検索されている(Guo et al., *Macromolecules*, 1996, 29, 2487-2493; Thurmond et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, 118, 7239-7240)。しかし、期待する効果を得るためにには、目的の細胞内の環境に応答して架橋が開裂し、PICMが解離することにより、内包されたDNAを放出しなければならない。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】したがって、本発明の目的は、殊に、PICMが少なくとも動物の細胞内に送達されるまでは安定であるが、細胞内ではPICMが容易に解離されるようなPICMの安定化手段を提供するにある。

## 【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者は、従来の共有結合による架橋に代え、ジスルフィド(-SS-)結合を介する架橋を利用すると、細胞外では安定に保持できるが、細胞内ではPICMが容易に解離しうることを見出した。理論により拘束されるものでないが、このような作用・効果は、動物細胞の内部が、一般的に、血漿中と比較してより強い還元的環境であることから(例えば、Huang et al., *Bioconjugate Chem.*, 1998, 9, 612-617参照)、ジスルフィド結合が細胞内ではチオールに還元され開裂することに起因するものと考えられる。

【0006】したがって、本発明は、親水性セグメントおよび荷電性セグメントを含むブロック共重合体と高分子電解質とから形成されるコアーシェル構造のポリイオンコンプレックスミセルの安定化方法であって、コア部を形成するブロック共重合体の荷電性セグメントに少なくとも1個のチオール残基を担持させ、該荷電性セグメント間でそれらに担持させたチオール残基を介するジスルフィド結合の架橋を形成させることを特徴とする前記安定化方法、に関する。

【0007】また本発明は、かような安定化方法によつて調製することのできる、例えば、一般式(1)

## 【0008】

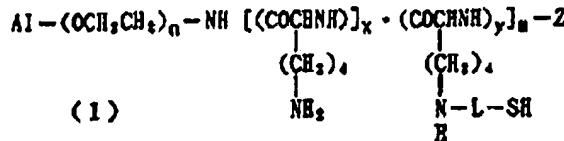
## 【化5】

(4)

特許2001-146556

5

6



【0009】式中、AIは水素原子またはアニオン重合開始剤の有機残基を示し、Zは水素原子または式 $-\text{SH}$ の残基を示し、Lは $\text{C}_{1-n}$ アルキレン、 $\text{C}_{1-n}$ アルキルフェニル、 $\text{C}_{1-n}$ アルキルフェニレン- $\text{C}_{1-n}$ アルキルからなる群より選ばれる連結基を示し、nは5~20,000、(好ましくは50~20,000)の整数であり、mは5~10,000の整数であり、そしてxの単位とyの単位の割合は20:1~1:2である、で表されるブロック共重合体と高分子電解質から形成されたコア-シェル構造のポリイオンコンプレックスミセルであって、水性媒質中でロア節を形成する該ブロック共重合体のポリアミンセグメント(式(1)でmの繰り返し単位を持つセグメント)と高分子電解質とがイオン対を形成しており、そして該セグメント内の少なくとも1個メルカブトを介して該共重合体の2分子以上が架橋していることを特徴とするポリイオンコンプレックスミセル組成物に関する。

【0010】またさらに、本発明は、上記一般式(1)で表されるブロック共重合体にも関する。

【0011】以下、本発明をより具体的に説明する。

【0012】本発明のコア-シェル構造のポリイオンコンプレックスミセルの安定化方法は、上述のようなジスルフィド結合を介してミセルが安定化されるものである限り、使用するブロック共重合体および高分子電解質は、それらの種類に制限されることなくすべて本発明に含まれる。かようなブロック共重合体は、それ自体既知の親水性セグメントと荷電性セグメントからなる共重合体に、必要により、適当な化学的手段でチオール残基を共有結合させたものが使用できる。親水性セグメントは、主として、ポリ(エチレングリコール)からなるものが好ましい。「主として」とは、ポリ(エチレングリコール)が、分子量比で、セグメント中の80%以上を占めるものであればよい。他方、荷電性セグメントは、いずれかのりH、好ましくは、pH 3.0~8.5の水性媒質(または水溶液)中で、カチオンまたはアニオンのいずれかに荷電しする基を繰り返し単位中に少なくとも1個含むセグメントを意味する。カチオンに荷電しする基としては、アミノ基またはイミノ基、さらには第四級アミノ基を挙げることができ、これらの基は、高分子側鎖に存在するか、さらにイミノ基もしくは第四級アミノ基にあっては高分子主鎖に存在しててもよい。アニオンに荷電しする基としてはカルボキシル基もしくはスルホ基または硫酸基を挙げることができ、これらの基は、

それらの基を高分子側鎖とする繰り返し単位を有するそれ自体既知の重合体を利用して、あるいはそのような重合体の製造方法を利用して、ブロック共重合体中に組み込むことができる。

【0013】本発明に従えば、これらの荷電性セグメント(の末端を含む)には少なくとも1個のチオール残基が担持されていることが必要である。ここでチオール残基とは、チオール化合物に由来する残基を意味し、これらの残基は例えば、上記アミノまたはイミノ基に保護されていてもよいメルカブト基含有アルキル化剤またはアシリル化剤を用い、あるいはカルボキシル基の場合には、カルボキシル基に保護されていてもよいメルカブト基含有アミンまたはアルコールを用い、常法により導入することができる。

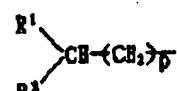
【0014】既知されるものでないが、親水性セグメントがポリ(エチレングリコール)であり、荷電性セグメントの荷電しする基がアミノ基またはイミノ基であるブロック共重合体としては、上記Kataoka(片岡) et al. 1. に記載されたPEG-P(Lys)や、Kabanov et al. 1., Bioconj. Chem. 1995, 6, 639に記載されたポリ(エチレングリコール)-ポリスペルミン共重合体や、また、本願と同時に係属する特願平11-221026号明細書に記載されるオキサゾリン由来のポリアミン単位を有するブロック共重合体が挙げられる。これらの共重合体の荷電性セグメントへのチオール残基の導入は、例えば、詳細には後述する、活性エスチル型のN-エスクシニミジル3-(2-ビリジルジオ)プロピオネートやこれらの類似物を用いて、アミノ基またはイミノ基をアシリル化し、次いで、ビリジルチオ基を還元開裂することにより実施することができる。

【0015】したがって、本発明の好ましい態様としては、上記一般式(1)で表されるブロック共重合体を用いる安定化されたPICミセルが提供される。一般式(1)で表されるブロック共重合体はそれ自体新規化合物である。

【0016】一般式(1)で表されるブロック共重合体におけるAIを規定するアニオン重合開始剤に有する有機残基は具体的には、式

【0017】

【化6】



(5)

特開2001-146556

【0018】(上記式中、(i) pは0~10の整数であって、かつR<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は、独立して、水素原子、C<sub>1~10</sub>アルコキシ、アリールオキシもしくはアリール-C<sub>1~10</sub>アルキルオキシ基を示すか、または、R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は、一緒にになって、C<sub>1~10</sub>アルキルで置換されていてもよいエチレンジオキシ(-O-CH(R<sup>1</sup>)-CH-O-)ここでR<sup>1</sup>は水素原子またはC<sub>1~10</sub>アルキルであるもしくはオキシ(-O-)基を示すか、または(ii) pは0または1であって、かつR<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は、一緒にになって並びもしくはその誘導体の残基を構成する原子団を示す、の基である。

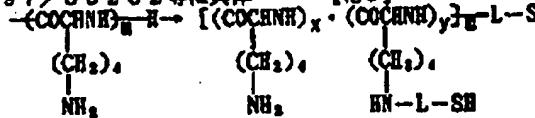
【0019】このような

【0020】

【化7】



【0021】セグメントを形成する方法は、例えば、上述の Kataoka et al., や、WO 96/32434, WO 96/33233, WO 97/06202等に具体



【0026】(上式中、LはC<sub>1~10</sub>アルキレン、C<sub>1~10</sub>アルキル-フェニル、C<sub>1~10</sub>アルキル-フェニレン-C<sub>1~10</sub>アルキル、フェニレンおよびカルボニル-C<sub>1~10</sub>アルキルからなる群より選ばれる連結基であり、好ましくはカルボニル-C<sub>2~10</sub>アルキルであり、そしてxの単位とyの単位の最適な割合は、m値によっても変動しうるので限定されないが、通常、20:1~1:2の範囲内にある。また、xの単位とyの単位は、それぞれブロシクを形成してもよいが、好ましくはランダムに配列される。)上記の反応スキームは、それ自体既知の反応、例えば、対応するモノ-ハロゲン化チオールを用いるアルキル化、対応する活性エステルを用いるアシル化によつて実施できる。

【0027】こうして、製造された、チオール残基を担持するブロック共重合体は新規化合物であり、本発明の一様である。

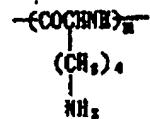
【0028】本発明に従うP I Cミセルの調製は、上記 Harada and Kataoka や Kataoka et al., に記載のそれ自体既知の方法により、親水性セグメントおよび荷電性セグメントとを含み、さらに電荷性セグメント中に少なくとも1個のチオール残基を担持させたブロック共重合体と高分子電解質とを水性媒質中で処理することにより行うことができる。処理法の具体例については、後述の実施例で説明するので参照することができる。

【0029】本発明のP I Cミセル中に内包される高分子電解質は、荷電性セグメントに応じてそれぞれ選ぶことができるが、一般的に、水性媒質(または水)中でイ

的に記載されている。これらの記載は、引用することによって本明細書に組み込まれる。また、かような親水性セグメントに、荷電性セグメント、例えば、

【0022】

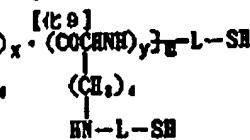
【化8】



【0023】を導入する方法は上述の Kataoka et al. や、そこで引用されている文献に詳細に記載されている方法に従えばよい。

【0024】本発明によれば、荷電性セグメントにチオール残基が例えば下記反応スキームに従って、共有結合的に導入される。

【0025】



オン解離する基を有するポリマーを意味する。しかし、本明細書では、所謂、オリゴマーと称される範囲に入るのも「ポリ」の接頭辞を付していることに注意されたい。したがって、高分子電解質として、ポリペプチド、オリゴペプチド、ブソイドペプチド、ポリスクレオチド、オリゴスクレオチドを挙げることができ、これらの直鎖状または環状であってもよい。ペプチド類には、それ自体既知の各種生理活性ペプチド、生理活性ブソイドペプチド、などが含まれ、ポリスクレオチドには、DNA断片、RNA断片、アンチセンスDNA、環状DNA、などが含まれる。これらのペプチド類またはポリスクレオチド類は、通常、pHによって、カチオンまたはアニオンに荷電しうる場合があるので、P I Cミセル調製条件を選択することにより、荷電性基がカチオンを生じるかまたはアニオンを生じるかのいずれのブロック共重合体と共に使用することもできる。しかし、ポリスクレオチド類を用いる場合には、カチオンを生じるブロシク共重合体、特に、一般式(I)で表されるブロック共重合体を用いてP I Cミセルを調製することが好ましい。

【0030】本発明に従えば、P I Cミセルが形成された後、ブロック共重合体の荷電性セグメントに担持させたチオール残基を介するジスルフィド結合による架橋が形成されることに特徴がある。かようなジスルフィド結合は、P I Cミセル含有水性媒質を酸化条件下に置くことにより形成できる。通常、酸化条件は周囲環境下への放置ないしは空気酸化される条件下に置くのがよい。本発明に關していう水性媒質とは、一般に、水、適当な緩

特許 2001-146556

(6)

10

衡剤また、場合によって電解質、さらには水混和性の弱気溶媒をも含む水溶液を意味する。

【0031】本発明に従う安定化されたPICミセルは電解質がかなり含まれる水性媒質中でも安定に存在することができるが、選元条件下の、特に一定濃度の電解質を含む水性媒質中では解離しうる。

【0032】したがって本発明によれば、特に高分子電解質を生体内に運搬または送達するために適する手段が提供できる。

【0033】

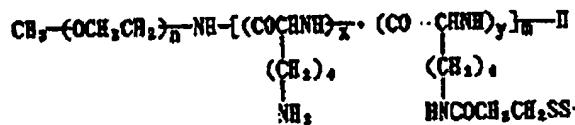
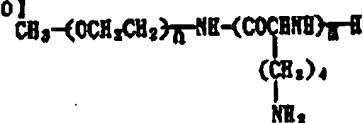
【実施例】以下、具体例を挙げて本発明をさらに説明するが、これらは本発明の理解を容易にするためのものであり、本発明をこれらに限定することを意図するものではない。

製造例：チオール残基が導入されたPEG-P(Lys)の製造

(1) PEG-P(Lys)の製造

【0034】

【化10】



【0039】PEG-P(Lys)へのビリジルジチオプロピオニル基(PDP基)の導入を行った。この導入は、N-スクシンイミジル3-(2-ビリジルジチオ)プロピオネート(SPDP)を用いて行った。PEG-P(Lys)は臭素酸塩のものを0.1N、pH6.5の酢酸緩衝液に溶解させ、同緩衝液に対して透析し、対イオンを酢酸イオンに交換して用いた。PEG-P(Lys)酢酸塩(200mg)とSPDP(56mg、リジン残基に対して0.5モル当量)を5mlのN-メチルピロリドン(NMP、5wt%の塩化リチウムを添加し脱気したもの)に溶解させた。この溶液に0.8mlのN,N-ジソプロピルエチルアミンを、アミンを脱プロトン化するために添加し、反応を開始した。反応液は、直立で1時間攪拌し、反応の過跡は逆相クロマトグラフィーによって行った。

【0040】反応の終了後、反応液をPEGの黄溶媒であるエーテルに滴下し再沈した。粗生成物をメタノールに溶解させた後、エーテルに再沈する操作を繰り返し、水に不要な不純物を取り除いた。過剰の塩は、生成物を0.1Nの酢酸水溶液に溶解させ、蒸留水に対して1時間透析することによって取り除いた。最終精製物は、凍

【0038】上述の Kataoka et al. に記載の方法に従って得られたα-メトキシル-アミノポリ(エチレングリコール)(PEG、Mw=5000)を開始剤として用い、(2-ベンジルオキシカルボニル-レーリシンのN-カルボン酸解水物(NCA)を開環重合することによってポリ(エチレングリコール)-ブロック-ポリ(2-ベンジルオキシカルボニル-レーリシン)(PEG-P(Lys)(Z))を製造した。こうして得られたPEG-P(Lys)(Z)のベンジルオキシカルボニル基(Z基)を30%HBr/AcOHで脱保護してPEG-P(Lys)を得た。

【0036】他方、高分子電解質のモデル化合物としてのポリ(L-アスパラギン酸)(P(A:p))は、β-ベンジル-L-アスパルテートのNCAの開環重合により重合したポリ(β-ベンジル-L-アスパルテート)(開始剤n-ブチルアミン)をアルカリ脱保護して得た。

【0037】PEG-P(Lys)のポリリシンセグメントおよびP(A:p)の置換度は、<sup>1</sup>H-NMR測定か

5、それぞれ22と15と求められた。

(2) PEG-P(Lys)へのチオール残基の導入

【0038】

【化11】

結晶化し回収した。収量は150mgであった(ポリマーのモル数から計算した収量は69%)。

【0041】得られたポリマーの構造は<sup>1</sup>H-NMR測定によって確認した(スペクトラムは図1参照)。PDP基の置換度は、<sup>1</sup>H-NMR測定とUV測定によって決定した。<sup>1</sup>H-NMR測定ではD<sub>2</sub>Oを溶媒として用い、PDP基のビリジル基のプロトン(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>N: 7.6ppm)とPEGのメチレン基のプロトン(OCH<sub>2</sub>: 3.5ppm)のピークの強度比から、置換度は6.8と求められた。UV測定では、PDP基をジテオスレイトール(DTT)によって還元したときに遊離する2-チオビリジンの吸光度(λ<sub>max</sub> = 343 nm, ε = 7.06 × 10<sup>3</sup>)から、置換度6.7と計算された。異なる二つの方法で求められた置換度は良く一致しており、リジンのアミノ基の約30%にPDP基が導入されたことが示された。

製造例2：ジスルフィド(SS)結合で内核を架橋したPICミセルの調製  
内核をSS結合で架橋したPICミセルの調製は以下の方法で行った。まず、上記の方法でPDP基を導入したPEG-P(Lys) (PEG-P(Lys)-PDP

(7)

特開2001-146558

11

12

P) を、10 mMリン酸緩衝液 (pH 7.4) に溶解させた後、0.1-μmのフィルターで濾過しゴミを除いた。次に、DTTをPDP基に対して3倍の濃度となるように加えて15分間搅拌し、PDP基をチオール残基に還元した。この溶液にP(A+p)をPEG-P(Ly<sub>s</sub>)-PDPの正電荷とP(A+p)の負電荷の比が1となるように添加しPICミセルを形成させた。ここで、PEG-P(Ly<sub>s</sub>)-PDPのアミノ基とP(A+p)のカルボキシル基は、PEG-P(Ly<sub>s</sub>)とP(A+p)の測定結果に基づいて、全てイオン化していると仮定した。

【0042】両ポリマーを混合し、2時間静置したあと、分画分子量6000-8000の透析膜を用いて、1Lの10 mMリン酸緩衝液 (pH 7.4) に対して透析し、DTTや2-チオビリドンを除いた。透析は3日間続け、この間、空気中の酸素によって、チオールをSS結合に酸化し架橋させた。3日間の透析後、未酸化のチオールが存在しないことは、Ellman法によって確認した。PICミセルの溶液は、透明で沈殿は認められなかつた。

#### 特性試験：光散乱法による架橋ミセルの特性解析

架橋したPICミセルの構造は、動的光散乱測定法 (DLS) によって評価した。ミセル溶液に対してDLS測定を行い、ヒストグラム法によってデータを解析して得られた結果から、架橋したPICミセルの粒径の分布は単峰性であり、分布の程度もかなり小さいことが示された ( $d_w/d_n = 1.10$ ) (図2参照)。拡散係数の測定角度依存性はなく、ミセルが球形であることも示唆された。また、測定の範囲内 (高分子濃度0.5-4.0 mg/m<sup>3</sup>) で拡散係数の濃度依存性ではなく、二次的な確実は認められなかった。無限希釈に外挿しもとめた拡散係数の値から、Stokes-Einsteinの式を用いて、ミセルの流体力学的半径は16.1 nmと計算された。キュムラント法によって求められた多分散度は0.08であり、天然のウィルスにも匹敵する値となつた。

【0043】また、透析前、チオールをSS結合に酸化する前のミセルの粒径は15.7 nmであった。透析前後PICミセルの粒径がほぼ同程度であるという結果は、SS結合の形成がミセルの構造に大きな影響を与えていないということを示唆している。少なくとも2週間、PICミセルの粒径に目立った変化はなかった。これは、PICミセルの内核が親水性のPEG層によって覆われておらず、それらの立体反発のため、コロイド粒子としての高い安定性を持っているためであると考えられる。

【0044】SS架橋のPICミセルの安定性に対する影響は、種々のNaCl濃度に対するミセルの見かけの分子量を静的光散乱法によって測定し評価した (図3参照)。チオールを導入しておらず架橋されていないPICミセルの場合は、NaCl濃度の増加とともに見かけ

の分子量は急激に減少する挙動がみられ、ミセルが解離した。一方、架橋ミセルの見かけの分子量の減少は、NaCl濃度0.5 Mにおいても非常に小さかった。また、DLSから求めたキュムラント粒径は、評価したNaClの濃度の範囲内で32.0 nmから35.2 nmであり、ミセルがNaCl濃度に対して著しく変化していないことが確認できた。

【0045】PICミセルの安定化が、SS結合の架橋の形成によるものであることを確認するために、還元剤を添加し散乱光強度の変化を追った (図4参照)。安定化がSS結合のために起こっているならば、高塩濃度下で、SS結合を選択的に開裂させる還元試薬であるDTTを添加するとPICミセルの解離が起こるはずである。実際に、DTT添加後の測定角度90°の散乱光強度を追跡した結果、散乱光強度の急激な減少が見られた。この減少は、ミセルの解離に対応していると考えられ、安定化がSS結合の形成によることが確認された。また、解離速度はDTTの添加濃度依存的であり、2 mMでは、50分程度でミセルは完全に解離した。また、このPICミセルの解離と同時に、内包されたP(A+p)は、溶液中に放出されると考えられる。

【0046】動物細胞中に最も大量に存在するSS結合の還元剤は、グルタチオンという低分子チオールであり、その濃度は細胞内では3 mM程度であるのに対し、血漿中では、その300分の1の10 μMのオーダーであることが知られている。このように、細胞内と細胞外で濃度が大きく異なり、SS結合の解離速度は還元剤の濃度に依存することから、SS結合で安定化したPICミセルを、DNAを含む生理活性をもつ高分子電解質、例えばポリアニオンの、細胞内への運搬体として利用することが可能であると考えられる。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】製造例1で得られたチオール残基の導入されたPEG-P(Ly<sub>s</sub>)の<sup>1</sup>H-NMRスペクトラムである。

【図2】製造例2で調製されたチオール化したPEG-P(Ly<sub>s</sub>)とP(A+p)から形成させたポリイオンコンプレックスミセルのs-平均粒径分布を示すグラフである。透析3日後、測定角度90°；温度25°C；ブロック共重合体濃度2 mg/m<sup>3</sup>；溶媒10 mM PBS (pH 7.4) の条件下に従う。

【図3】架橋ミセル (黒丸) および架橋をしていないミセル (白抜き丸) のNaCl濃度に対する見かけの分子量の変化を示すグラフである。ブロック共重合体濃度1 mg/m<sup>3</sup>；温度25°C；溶媒10 mM PBS (pH 7.4) の条件下に従う。

【図4】本発明に従うPICミセル溶液へジチオスレート (DTT) 添加した後の散乱光強度の変化を示すグラフである。DTT添加濃度：0.5 mM (丸)、1.0 mM (四角)、2.0 mM (三角)；ブロック共重合

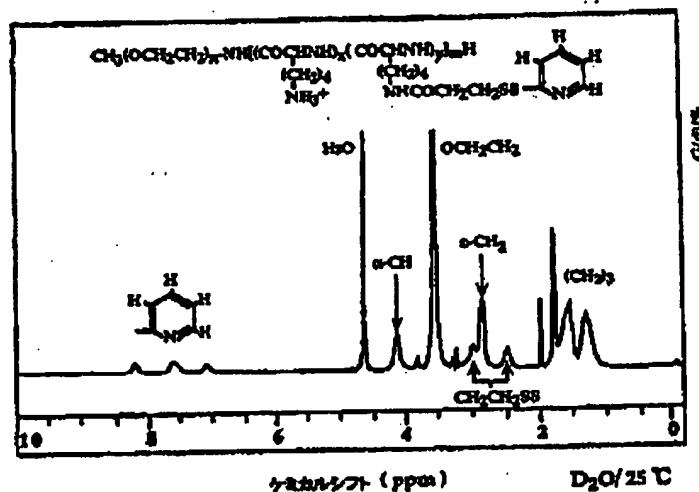
特許2001-146556

(8)

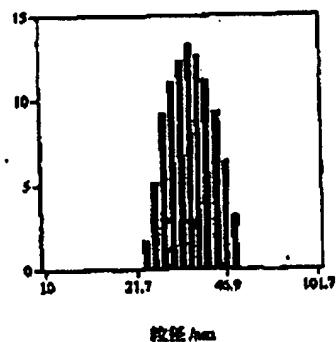
14

体濃度1.0 mg/ml; NaCl濃度0.3M; 濃度2  
5°C; 液体10 mM PBS (pH 7.4) の条件に行

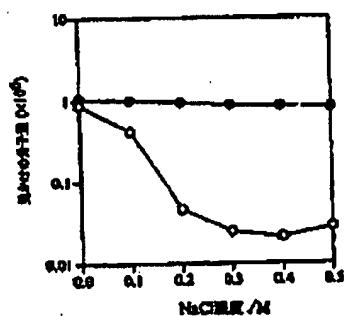
[図1]



[図2]



[図3]



[図4]

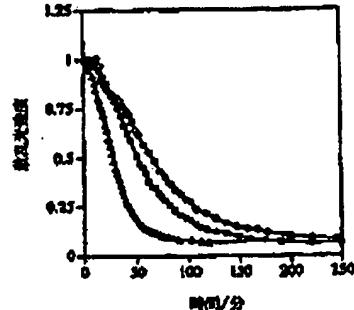


図 3.DTT濃度の蛍光強度の変化  
(DTT: 0.5 mM Cd, 1.0 mM DCD, 2.0  
mM (△); 高分子量: 1.0 mg/ml  
(NaCl): 0.3 M; 濃度 25°C; 液体 10  
mM PBS (pH 7.4))

フロントページの続き

Fターム(参考) 40076 AA12 AA16 AA95 CC47 CC50  
EE23 EE41 FF43 FF63  
4J002 AD00X AD001 CH051 GB00  
GB01 HA07  
4J005 AA04 BB02 BD06

This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT OR DRAWING
- BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- GRAY SCALE DOCUMENTS
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**  
**As rescanning documents *will not* correct images**  
**problems checked, please do not report the**  
**problems to the IFW Image Problem Mailbox**